

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Tiermodell

Zu den zahlreichen orthopädischen Problemen, die allein durch klinische Untersuchungen nicht gelöst werden können, zählen u. a. Pseudarthrosen. Erkenntnisse über Entstehung, Morphologie und mögliche Therapieansätze dieser und anderer Erkrankungen können im Tierexperiment gewonnen werden. Sinn des Tierexperiments ist die Vergleichbarkeit der aus diesen Versuchen gewonnenen Daten und Erkenntnisse mit humanen Erkrankungen. Dennoch gibt es keine Garantie, dass die im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnisse auch auf die humane Situation übertragen werden können.

Post mortale Studien menschlicher Proben erlauben zwar histologische und biochemische Untersuchungen, geben jedoch geringen Aufschluss über zelluläre Mechanismen. Zudem ist die Probenanzahl häufig sehr niedrig und es existieren oftmals keine Kontrollgruppen, die einen Vergleich zulassen (Roach et al., 1989). In dieser Studie wurde die Ratte als Versuchstier gewählt. Obwohl die Muskuloskeletale Anatomie der Ratten in Anbetracht der Größe kritisch für chirurgische Vorgehensweisen ist, werden Rattenmodelle häufig zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen über skeletaler Reparatursprozesse herangezogen (Jäger et al., 2005c). Dieses Projekt dient zwar der humanen Forschung, dennoch sollen zunächst grundlegende Erkenntnisse darüber gewonnen werden, inwieweit die hier gewählte Therapieform (Applikation autologer mesenchymaler Stammzellen) Einfluss auf die knöcherne Regeneration einer Heilungsstörung nimmt. Sollte diese Therapiemaßnahme positiven Einfluss auf die Knochenregeneration im Rattenmodell nehmen, so kann dieser Versuch in modifizierter Form in einer Großtierspezies, deren Knochen morphologisch dem humanen Knochen eher als der der Ratte entsprechen, wiederholt werden. Da die vorliegende Arbeit Teil einer umfangreichen Knochenheilungsstudie ist, bei der neben der Etablierung der hier zum Einsatz kommenden Methode auch die Auswirkungen bereits osteogen prä-differenzierter autologer Stammzellen in eine Pseudarthrose-Situation untersucht wurden und bei der die Femora der jeweils angewandten Methode auch biomechanisch getestet wurde, war eine relativ große Tierzahl notwendig, zumal alle Untersuchungen zu zwei Zeitpunkten erfolgten. Das deutsche Tierschutzgesetz verlangt unter den zur Auswahl stehenden Tierarten, die zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung geeignet erscheinen, die Wahl der Spezies mit den geringsten sensorischen Funktionen und der

phylogenetisch niedrigsten Entwicklungsstufe (Jäger et al., 2005b). Für Versuche am Knochen stellt die Ratte aufgrund ihrer limitierenden anatomischen Größenverhältnisse häufig eine kritische untere Grenze unter den Kleintieren dar (Jäger et al., 2005c), weshalb auch auf den Einsatz von Mäusen verzichtet wurde. Da der Rattenknochen größer als der der Mäuse ist, eignet er sich auch für biomechanische Testungen (Nunamaker, 1998), die, wie bereits erwähnt, auch im Rahmen dieser Studienreihe stattfanden. Geringe Erwerbs- und Unterbringungskosten sowie eine leichte Handhabung machen die Ratte zu einem attraktiven Versuchstier, so dass auch größere Tiergruppen verwendet werden können. Zudem ist ihr Einsatz ethisch weniger bedenklich als der höher entwickelter Tierarten (Jäger et al., 2005b; Nunamaker, 1998).

Um die aus dem Tierexperiment gewonnene Daten auf die humane Situation übertragen zu können, sollten Tiermodelle gewählt werden, bei denen die zu untersuchenden Parameter möglichst ähnlich dem des Menschen sind (Roach et al., 1989). Der Rattenknochen unterscheidet sich histologisch von dem des Menschen. Er weist ausschließlich Primärosteone auf, welche von ihrer Umgebung nicht durch eine Zementlinie getrennt werden. Auch besitzt er, anders als der menschliche Knochen, kein Havers-System (Nunamaker, 1998). Primärosteone sind so genannte Appositionsosteone. Bei höher entwickelten Spezies treten Primärosteone nur fetal und unmittelbar post natal auf. Sie werden im Laufe des Wachstums durch Sekundärosteone (Substitutionsosteone) ersetzt. Auch weist der die Primärosteone umgebene Geflechtknochen im Gegensatz zu dem die Sekundärosteone umgebene Lamellenknochen eine vergleichsweise ungeordnete Struktur auf. Da Hunde und Primaten ähnlich dem Menschen Sekundärosteone aufweisen, eignen sich diese Tierarten gemäß Eitel und Mitarbeiter (1981) als adäquates Model zur Übertragung der gewonnenen Daten auf die humane Situation. Aufgrund ethischer Bedenken, aber auch aufgrund höherer Kosten in Anschaffung und Unterbringung, wurde von diesen Tierarten Abstand genommen (Nunamaker, 1998). Hinsichtlich der Knochenzusammensetzung bestehen die größten Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Knochen bei Hund und Schwein. Die Ratte hingegen weist unter den häufig verwendeten Tierarten die größten Abweichungen von der humanen Knochenzusammensetzung auf (Aerssens et al., 1998). Schafe werden häufig als Versuchstiere für Frakturheilungsstudien eingesetzt, da gerade die ovine Tibia große anatomische Übereinstimmungen mit der humanen Tibia aufweist (Nunamaker, 1998). Aber ebenso wie der Ratten- und Kaninchenknochen sind die Knochen des Schafes überwiegend aus Primärosteonen aufgebaut (Eitel et al., 1981). Nachteil bei der Verwendung dieser Spezies sind die mit der Größe dieser Tiere verbundenen höheren Unterbringungs- und

Haltungskosten sowie ein erhöhter Platzbedarf, so dass die Verwendung dieser Tierart in manchen Forschungshäusern nicht realisierbar ist (Nunamaker, 1998). Rind und Pferd besitzen eine dem Menschen vergleichbare Heilungszeit, dennoch wurde auf die Verwendung dieser Tierarten verzichtet, da ihre Unterbringung und Versorgung einen sehr hohen finanziellen Aufwand darstellen (Roach et al., 1989), zumal vor allem Pferde nicht sehr kooperative orthopädische Patienten sind (Nunamaker, 1998).

In Anbetracht der unterschiedlichen Anatomie und Unterschiede im Heilungsablauf können die hier gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf die humane Situation übertragen werden (Nunamaker, 1998). Da die vorliegende Arbeit der Grundlagenforschung dient, ist die Verwendung der Ratte als Versuchstier gerechtfertigt, zumal die an der Frakturheilung beteiligten Zellen bei der allen anderen Tierarten die gleichen sind und gleiche Funktionen besitzen, so dass hier Rückschlüsse auf die zellulären Abläufe beim Menschen möglich sind (Roach et al., 1989).

Die für diese Studie ausgewählten Tiere entsprachen untereinander in Rasse, Alter und Gewicht. Um den Einfluss unterschiedlicher Östrogenlevel auf die Knochenheilung auszuschließen, wurden ausschließlich männliche Tiere gewählt. Die Tiere wurden randomisiert in beide Gruppen eingeteilt. Die prä- und postoperativen Haltungsbedingungen waren für alle Tiere dieselben, auch unterschieden sich die Operationsmethode, das verwendete Fixationssystem und die Standzeiten der Tiere nicht voneinander. Somit konnte gesichert werden, dass die von Außen auf die Heilung einwirkenden und beeinflussbaren Faktoren bei allen Tieren identisch waren.

5.1.2 Versuchsaufbau

Knochenmarkentnahme und Anzucht der MSCs

Durch die Applikation autologer, also vom Tier selbst stammender mesenchymaler Stammzellen in den Osteotomiespalt war es nicht erforderlich, das Immunsystem der Tiere zu supprimieren. Auch konnte so auf den Einsatz von athymischen Tieren verzichtet werden, da eine Immunreaktion auf die transplantierten Zellen nicht erwartet wurde. Da die mesenchymalen Stammzellen während der Kultivierungsperiode von den nicht hämatopoetischen Elementen aufgrund ihrer Adhärenz selektiert werden konnten (Bianco et al., 2001, Friedenstein et al., 1976) und sich durch die Wahl eines geeigneten Nährmediums in hohem Maße replizierten (Bruder et al., 1998), war es ausreichend, eine kleine Menge Knochenmark zu aspirieren. Der Eingriff erwies sich als nicht sehr invasiv und gestaltete sich einfach. Die Entnahme verlief in allen Fällen komplikationslos. Die Tiere erhielten eine

Inhalationsanästhesie, aus der sie unmittelbar nach dem Eingriff erwachten und sich anschließend unauffällig verhielten. Zur Wahrung standardisierter Bedingungen wurde auch den Tieren der Medium-Gruppe Knochenmark entnommen. Um die Differenzierung der Zellen zu verhindern, enthielt das Anzuchtmedium keine zusätzlichen Agenzien. Auch nach der intensiven Kultivierungsperiode behielten die Zellen ihre für mesenchymale Stammzellen charakteristische spindelförmige Gestalt (Friedenstein et al., 1976), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass keine Differenzierung der Zellen in eine spezifische Richtung stattfand. Das Beibehalten des mesenchymalen Stammzellcharakters konnte durch den Nachweis der für die MSCs typischen Oberflächenantigene CD 45-, CD 44+, CD 73+ und CD 90+ (Pittenger et al., 1999) bestätigt werden.

Chirurgische Vorgehensweise

Um die Auswirkungen lokal applizierten autologen MSCs auf die gestörte Knochenheilung zu untersuchen, war es unter anderem Ziel dieser Versuchsreihe, eine atrophe Pseudarthrose-Situation zu schaffen. Dies gestaltet sich in der Experimentalchirurgie als sehr schwierig und stellt eine Herausforderung für Chirurg und Wissenschaftler dar (Volpon, 1994). So wurden zur Unterbrechung der Heilung Artefakte wie Polyethylene oder Metallklammern in den Frakturspalt inkooperiert. Diese Methoden sind eher künstlicher Natur als das sie dem wahren klinischen Bild atropher Pseudarthrosen entsprechen würden (Volpon, 1994). In der Mehrzahl der Versuche, eine atrophe Pseudarthrose zu schaffen, wurden segmentale Knochendefekte kreiert, indem definierte Knochensegmente entnommen wurden (Boyan et al., 1999; Harrison et al., 2003; Ohgushi et al., 1989; Volpon, 1994). Die Fragmentenden dieser Defekte sind vaskularisiert, ihr biologisches Heilungspotential nicht eingeschränkt. Die knöcherne Überbrückung unterbleibt nur aufgrund der Defektgröße (Kuner et al., 1996; Schmitz et al., 1986).

Ein Knochenverlust ist primär keine Ursache atropher Pseudarthrosen, kann jedoch sekundär nach Resektion von totem Knochengewebe als therapeutische Maßnahme auftreten (Runkel et al., 2000). Kritische Defekte spiegeln somit nicht die Bedingungen wieder, unter denen sich atrophe Pseudarthrosen entwickeln. Ursachen, die zur Entstehung atropher Pseudarthrosen führen, liegen v. a. in der Reduktion des biologischen Potentials, sei es z.B. durch eine unfallkausale oder operationsbedingte Schädigung des Periosts (Runkel et al., 2000; Stürmer, 1996; Yoo et al., 1998) und/ oder durch Schädigung bzw. Zerstörung der Blutversorgung (Kutscha-Lissberg et al., 2003; Runkel et al., 2000). Hietaniemi und Team (1995) schufen ein atrophes Pseudarthrose-Model der Ratte, indem sie das Periost 2 mm proximal und distal der

Osteotomie thermisch zerstörten, die Osteotomie jedoch mit einem intramedullären Kirschner-Draht fixierten. Das intramedulläre Fixationssystem dieses Modells ließ eine sehr große Rotationsbewegung der Fragmente zu. Das hatte zur Folge, dass sich zunächst eine hypertrophe Pseudarthrose entwickelte. Ein atrophes Erscheinungsbild konnte sich erst nach einem Jahr einstellen (Hietaniemi et al., 1995). Des Weiteren kam es zu einer hohen Rate von Draht-Migration und Systemermüdung (Kokubu et al., 2003). Der Vorteil dieses Modells lag aber in der Schaffung einer Fraktur, welche die klinischen Bedingungen besser widerspiegelt als eine künstlich geschaffene Osteotomie. Kokubu und Mitarbeiter (2003) erkannten dieses Problem und versuchten es durch die Vergrößerung des Drahtdurchmessers bei ansonsten gleicher Vorgehensweise zu beheben. Aber auch durch die Vergrößerung des Drahtdurchmessers blieb das Problem der zu hohen Rotationsbewegung bestehen. Die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen klar erkennen, dass die Stabilität der Fragmente durch das externe Fixationssystem erhalten blieb. Es finden sich weder radiologische noch histologische Anzeichen der Etablierung einer hypertrophen Pseudarthrose oder der Verschiebung der Fragmente gegeneinander. Die Injektion der mesenchymalen Stammzellen in den Osteotomiespalt erwies sich als nicht sehr einfach. Der Osteotomiespalt musste mit der Kanülenspitze ertastet werden. Die Injektion erfolgte allein unter manueller Führung. Zeigte sich der Osteotomiespalt als sehr schmal, so war es schwer, eine exakte intramedulläre Injektion zu gewährleisten. Die Implantation eines intramedullären Nagels würde die Injektion noch schwieriger, wenn nicht sogar als unmöglich gestalten, da der Nagel aufgrund seiner Lokalisation eine intramedulläre Injektion verhindern würde. Einhorn und Mitarbeiter verwendeten zur Stabilisierung eines 6 mm großen Femurdefektes im Rattenmodell ein auf PMMA-basierenden Fixateur externe, der zwar eine leichte Implantation erlaubt, aber mit einer hohen Versagungsrate einhergeht (Einhorn et al., 1984). Jäger und Kollegen (2005c) geben an, dass es bei der Verwendung von aus Stahl bestehenden Querbalken zu einer stärkeren Belastung der Kirschner-Drähte kommt. Das wiederum führte in ihrem Modell zu einer lokalen Osteolyse um die Kirschner-Drähte. Anhand der veröffentlichten Röntgenbilder lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Osteolysen durch Drucknekrosen infolge nicht paralleler Pin-Implantation zurückzuführen sind. Diese Möglichkeit wird vom Autor zwar kurz erwähnt, jedoch ohne näher auf mögliche Fälle im eigenen Modell einzugehen. Harrison und Mitarbeiter erhöhten durch die Vergrößerung der Durchmesser der Kirschner-Drähte von 1,0 mm auf 1,2 mm die Steifigkeit des Fixateurs und konnten dadurch deutlich weniger Drahtlockerungen und Osteolysen erzielen. In der hier präsentierten Studie betrug der Durchmesser der K-Drähte 1,25 mm. Radiologisch und

histologisch waren keine Osteolysen sichtbar. Es muss aber angemerkt werden, dass dies eventuell auch mit der kurzen Standzeit der Tiere in Verbindung gebracht werden kann. Bei längeren Heilungszeiten könnten eventuell Osteolysen beobachtet werden.

Eine standardisierte Vorgehensweise zur Freilegung des Femurs unter Schonung der Weichteile konnte am ehesten durch einen lateralen Zugang und durch die stumpfe Präparation der Fascie zwischen M. vastus lateralis und M. biceps femoris ermöglicht werden. Auch Jäger und Mitarbeiter (2005c) geben an, dass der laterale Zugang einen ausreichenden Überblick über die anatomische Situation erlaubt. Durch die Verwendung der Pin-Löcher des Fixateur-Querbalkens als Leitschiene für die Bohrungen konnte ein definierter Abstand zwischen den einzelnen Kirschner-Drähten bei jedem Tier garantiert werden. Die monolaterale Bohrung und bikortikale Verankerung der Kirschner-Drähte gewährleistete die stabile Fixation der Osteotomie. Das wird auch dadurch deutlich, als dass es bei keinem der Versuchstiere zu einem Implantatversagen gekommen ist. Durch die Verwendung zweier Stahlplatten eines Fixateur-Querbalkens erwies sich der Knochen-Querbalkenabstand ebenfalls bei jedem Tier als standardisiert, was radiologisch überprüft wurde.

Die Schaffung einer atrophen Pseudarthrose erfolgte in Anlehnung an die Modelle von Hietaniemi (1995) und Kokubu (2003). Die Entfernung des Periosts durch Abziehen (stripping) von der darunter liegenden Kortikalis erweist sich als nicht sehr effektiv. Häufig verbleibt das Stratum cambium am Knochen. Das Stripping stellt sogar einen mechanischen Stimulus dar, der die Progenitorzellen der verbleibenden Cambiumschicht zur Proliferation anregt (Simon et al., 2003). Nach Osteotomie wurde das Periost deshalb 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes mit Hilfe eines Kauters thermisch zerstört. In der Studie von Hietaniemi und Kokubu konnte 8 Wochen nach Osteotomie radiologisch und histologisch die Entstehung einer atrophen Pseudarthrose dargestellt werden. Kokubu sah die Ursache in einer gestörten Blutzufuhr als Folge der periostalen Zerstörung. Die Cambiumschicht des Periosts beinhaltet Vorläuferzellen mesenchymalen Ursprungs, denen die Fähigkeit zur knöchernen Regeneration zugesprochen wird und die an der Knochenheilung beteiligt sind (McKibbin, 1978; Yoo et al., 1998). Ein Ausbleiben der Heilung ist somit nicht ausschließlich Folge inadäquater Blutzufuhr, sondern auch auf den Mangel an Vorläuferzellen infolge periostaler Zerstörung zurückzuführen. Um den Einfluss im Osteotomiebereich vorhandenen Vorläuferzellen auf die Heilung auszuschließen, wurde im osteotomierten Bereich das Knochenmark, als Hauptquelle mesenchymaler knochenbildender Stammzellen (Cancedda et al., 2003) entnommen. Es kann durch die hier gewählte Vorgehensweise aber nicht vollständig gewährleistet werden, dass alle zur knöchernen Regeneration fähigen

Vorläuferzellen aus dem Osteotomiebereich entfernt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte chirurgische Vorgehensweise ermöglichte eine uniforme Reproduzierbarkeit des Modells bei allen Versuchstieren.

Von einer atrophen Pseudarthrose wird beim Menschen frühestens sechs Monate nach der Fraktur gesprochen (Jones et al., 2005; Rüter et al., 1999). Phylogenetisch bedingt weist die Ratte eine höhere Heilungsgeschwindigkeit als der Mensch auf (Roach et al., 1989). Kokubu (2003) und Hietaniemi (1995) konnten deshalb in ihren Rattenmodellen bereits acht Wochen nach der Fraktur die Etablierung einer atrophen Pseudarthrose radiologisch und histologisch nachweisen. Ein Kriterium atropher Pseudarthrosen ist, unabhängig von der Spezies, dass sämtliche Reparationsprozesse zum Stillstand gekommen sind. Das kann natürlich erst zu einem späteren als dem hier gewählten Beobachtungszeitpunkt beurteilt werden. Daher kann zum Zweiwochenzeitpunkt noch nicht von einer atrophen Pseudarthrose gesprochen werden, wohl aber in Anbetracht der Modelle von Kokubu (2003) und Hietaniemi (1995) von einer Situation, die zu einer atrophen Pseudarthrose führen könnte.

Transplantation der autologen MSCs

Die Transplantation der MSCs erfolgte bei den Tieren der MSC-Gruppe zwei Tage nach der Osteotomie. Um den Einfluss des Kultivierungsmediums auf die Knochenheilung auszuschließen, erfolgte bei den Tieren der Medium-Gruppe analog zur Zell-Transplantation in der MSC-Gruppe die Injektion einer äquivalenten Menge des Kultivierungsmediums in den Osteotomiespalt. Auch Takushima und Mitarbeiter (1998) sowie Shao und Kollegen (2007) verwendeten in ihren Kontrollgruppen anstelle der Zell- die Medium-Suspension. Die Applikation erfolgte unter manueller Kontrolle. Als Leitschiene zur intramedullären Injektion eignete sich die Kerbe des Fixateur-Querbalkens. Die intramedulläre Injektion wurde in Vorversuchen mit Hilfe eines radiologisch darstellbaren Kontrastmittels, welches anstelle des Mediums in den Osteotomiespalt injiziert wurde, unter Durchleuchter-Kontrolle überprüft.

5.1.3 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Da der externe Fixateur die Osteotomie stabilisierte, erwies sich die Entnahme der Femora als nicht sehr kritisch, obgleich der Osteotomiespalt mit fibrösem Gewebe gefüllt war und keine knöcherne Überbrückung der Fragmente zum Entnahmezeitpunkt stattfand. Der Fixateur verblieb bis zur Einbettung der Präparate am Knochen, so dass während der gesamten histologischen Aufarbeitung ein Zerreißen des die Osteotomie umgebenden Gewebes

verhindert wurde. Durch die Fixierung der Präparate in Formaldehyd härtete das Gewebe aus, so dass der Fixateur komplikationslos entfernt werden konnte.

Um repräsentative Aussagen zu treffen, müssen zur Auswertung möglichst optimale Schnitte herangezogen werden. Das Schneiden der unentkalkten Knochen am Hartschnittmikrotom stellte sich als nicht unkompliziert dar. Durchdrang die Prä- und Infiltrationslösung nicht im erforderlichen Maße den Knochen, so konnten die Femora am Mikrotom nicht geschnitten werden, ohne dass es zu einer starken Zerreißen der Knochen kam. Diese Präparate mussten in MEA aufgelöst, erneut prä- und infiltriert und anschließend eingebettet werden. Nach dem erneuten Auflösen und anschließendem Einbetten ließen sich die Knochen komplikationslos schneiden. Dennoch traten schneidbedingte Risse auf. Diese Artefakte wurden bei der Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse manuell korrigiert.

Die Unterscheidung von Bindegewebe und Knorpel erfolgt üblicherweise in der Safranin Orange/Lichtgrün-Färbung. Diese Färbung stellte eine Herausforderung dar. Wurden in Technovit gefärbte Präparate diesem, auch mehrmals modifiziertem, Färbeprozess unterzogen, so waren v. a. die kortikalen Strukturen gegeneinander verschoben und stark aufgefaserter. Auch unterschied sich die Anfärbung und Intensität des Knorpelgewebes von Präparat zu Präparat bei Einhaltung der gleichen Färbeprotokolle selbst innerhalb eines Färbdurchgangs. Knorpel wurde zum Teil nicht angefärbt, andere Strukturen dafür umso stärker. Eine standardisierte Auswertung ließ sich anhand dieser Färbung nicht garantieren. Alternativ lässt sich Knorpel auch in der Masson-Goldner- und in der Movat Pentachrom-Färbung darstellen. Aber auch hier wurden ähnlich unbefriedigende Färbeergebnisse erzielt. Eine standardisierte Auswertung anhand dieser Färbungen war somit nicht möglich. Eine mögliche Erklärung ist die Anfälligkeit des in Technovit eingebetteten Gewebes gegenüber bestimmten Färbechemikalien. Die Auffaserung der knöchernen Strukturen in diesen Färbungen konnten in den in Paraffin eingebetteten Knochen nicht beobachtet werden. Entkalkte Präparate konnten für diese Quantifizierung des Knorpels jedoch nicht herangezogen werden. Alternativ erfolgte die Bestimmung des Knorpels im nicht mineralisierten Anteil der Osteotomiezone in der Safranin Orange/von Kossa-Färbung anhand manueller Markierung.

5.1.4 Histomorphometrie

Die computergestützte Bildanalyse erleichtert die Auswertung histomorphometrisch zu erhebender Daten (Hunt et al., 1995). Zunehmend findet sie Einsatz in der Grundlagenforschung und in der Diagnostik bestimmter Knochenerkrankungen (Flygare et al., 1997). Die Quantifizierung bestimmter Parameter mit Hilfe der Bildanalyse bietet die

Möglichkeit, repräsentative Messung von mehreren Untersuchern vornehmen zu lassen. Dadurch ist eine relativ benutzerunabhängige und einfache Auswertung der Präparate möglich. Die Programme lassen sich leicht modifizieren und ermöglichen so eine Anpassung an die Anforderungen der jeweiligen Arbeitsgruppe.

Zur histomorphometrischen Analyse gelangen pro Gruppe 16 in Paraffin eingebettete, nach Movat Pentachrom und nach Kollagen-II gefärbte Präparate, wobei jedes Tier mit je einem Schnitt pro Färbung in die Auswertung einging. Von den in Technovit eingebetteten Knochen wurden je Tier vier nach Safranin Orange/von Kossa gefärbte Präparate histomorphometrisch ausgewertet.

Die Movat Pentachrom-Färbung ermöglicht die farbenprächtige Unterscheidung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Auch Zelltypen können leicht erkannt und bestimmt werden. Diese Färbung eignet sich deshalb nicht nur für die beschreibende Histologie sondern auch für die computergestützte Bildanalyse (Olah et al., 1977). Die Movat Pentachrom-Färbung diente der histomorphometrischen Bestimmung der knöchernen und bindegewebigen Strukturen im Paraffinschnitt, da Osteoklasten und Gefäße nicht als Absolutzahl, sondern deren Dichte im Gewebe bestimmt werden sollte. Auch musste das Kollagen-II auf die jeweiligen Flächen bezogen werden. Dies jedoch konnte nur durch die histomorphometrische Analyse der Knochen- bzw. Bindegewebsfläche ermöglicht werden. Zwar wurde im Safranin Orange/von Kossa-Präparat auch Knochen- und Bindegewebsflächen bestimmt, es handelte sich hier jedoch um andere Tiere, als die, die in die Osteoklasten- und Gefäßzählung eingingen. Durch die Analyse von je Tier vier nach Safranin Orange/von Kossa gefärbte Präparate soll die Genauigkeit der Untersuchungen erhöht werden. Von diesen vier Präparaten ging jeweils der Median in die statistische Auswertung ein. Es konnte während des Schneidvorganges jedoch nicht gewährleistet werden, dass es sich bei den vier Präparaten um Serienschnitte handelt. So ergaben sich mitunter bei einem Tier Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild der Osteotomiezone, welche auf die unterschiedlichen Schnittebenen zurückzuführen sind. Dadurch treten mitunter große Streuungen bestimmter histomorphometrisch analysierter Flächen innerhalb eines Tieres auf. Als Beispiel betrug die kleinste Bindegewebsfläche des endostalen Kallus bei Medium-Tier Nr. 118 $4,93 \text{ mm}^2$, die größte endostale Bindegewebsfläche dieses Tieres jedoch $8,77 \text{ mm}^2$. Es resultiert eine Spanne von $3,84 \text{ mm}^2$. In die statistische Auswertung ging der Median-Wert der vier Präparate mit $6,84 \text{ mm}^2$ ein. Anhand dieses Beispiels wird einerseits ersichtlich, dass es sinnvoll ist, bei Verwendung mehrerer Präparate, die nicht als Serienschnitte gewonnen wurden, den Median-Wert statistisch auszuwerten. Ist die Verwendung von Serienschnitten nicht möglich, sollte

andererseits darüber nachgedacht werden, pro Tier ein Präparat histomorphometrisch zu analysieren, das nach einer bestimmten, immer gleichen Schnittanzahl gewonnen wird.

Die Höhe der ROI wurde vom Computer vorgegeben. Die Festlegung der ROI-Breite erfolgte untersucherabhängig, wobei sich an der maximalsten Breite des Gesamt-Kallusdurchmessers orientiert wurde. Das Programm erkennt bestimmte Gewebe an ihrem Farbton und berechnet die entsprechenden Flächen anhand der Sequenzierung. Die Safranin Orange/von Kossa-Färbung ermöglicht die Unterscheidung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe. Übergänge, die an Kontaktflächen zwischen Knochen- und Bindegewebe auftreten, stellen sich in dieser Färbung oftmals dunkelrot dar. Diese Farbtöne ordnete der Computer mitunter fälschlicherweise mineralisiertem Gewebe zu. Dieser Fehler musste erkannt und manuell korrigiert werden. Schwierig gestaltete sich die Einzeichnung des Hartkallus in Kontaktbereichen mit der Kortikalis, da beide nicht immer eindeutig voneinander abgrenzbar waren. Schneid- und färbebedingte Artefakte traten vor allem in der Kortikalis der in Technovit eingebetteten Präparate auf. Auch diese mussten erkannt und manuell nachgebessert werden. Auch dabei konnten untersucherindividuelle Fehler auftreten. Um die genannten Fehlerquellen zu minimieren, erfolgte die Auswertung unter mikroskopischer Sichtkontrolle. Die Vielfältigkeit der Präparate und die unterschiedliche Qualität müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Durch die Verwendung standardisierter Methoden können intra- und interindividuellen Unterschiede zwar minimiert, subjektive Entscheidungen jedoch nie völlig vermieden werden (Wright et al., 1992).

5.1.5 Histologie

- **Deskriptive Histologie**

Die Beschreibung der Präparate erfolgte nach von der Untersucherin selbst erstellten Gesichtspunkten. Sie ist deshalb rein subjektiv und lässt keine Wertung zu, wie dies bei Verwendung eines validierenden Scores möglich wäre. Bei einem Score werden für das Auftreten oder die Abwesenheit eines bestimmten Merkmals Punkte vergeben. Die Höhe der Punktzahl eines Präparats entscheidet dann über die Qualität der Heilung. Probleme treten dann auf, wenn Merkmale, die für die Beurteilung der Heilung unterschiedlich wichtig sind, mit derselben Scorezahl gewertet werden. Die Gefahr besteht in der Erzielung falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse. Die subjektive Beurteilung in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Histomorphometrie scheint eine objektive Möglichkeit der Beurteilung des Heilungsverlaufes zu ermöglichen.

- **Gefäßzählung**

Durch immunhistochemische Verfahren lassen sich spezifische Gewebestrukturen selektiv und eindeutig darstellen. Sie können so einfach erkannt und ausgewertet werden. Nachteile dieser Nachweismethoden liegen im hohen Zeit- und Kostenaufwand. Auch muss angemerkt werden, dass die Färbungen nicht immer gelingen und auch innerhalb eines Färbedurchgangs präparateabhängige Unterschiede in der Anfärbung der gewünschten Strukturen bestehen können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immunhistochemischen Nachweisverfahren sind in diesem Forschungshaus etablierte und erfolgreich angewendete Verfahren.

Der immunhistochemische Nachweis des α -smooth muscle actin erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben (Lienau et al., 2005). Die Gefäße wurden analog der in der Histomorphometrie festgelegten ROIs (periostal, endostal und separat im Osteotomiespalt) gezählt. Durch das Einscannen der Präparate und Markierung der Gefäße mit Hilfe eines Computerprogramms sollte eine möglichst hohe Messgenauigkeit erzielt werden. In dieser Färbung wurde die glatte Muskulatur der Gefäße rot dargestellt und konnten so von umliegenden Gewebestrukturen unterschieden werden. Neu gebildete Kapillaren, die nur aus Endothelzellen bestehen, können mit dieser Färbung nicht erfasst werden (Lienau et al., 2005). Diese Kapillaren lassen sich anhand des immunhistochemischen Nachweises des von Willebrand Faktors der Endothelzellen darstellen. In Vorversuchen ergab diese Färbung jedoch keine zufrieden stellenden Ergebnisse. Hier lag zum einen die Anzahl nicht gefärbten Gefäße deutlich über denen der α -sma-Färbung. Zum anderen schwankte die Gefäßanfärbung von Präparat zu Präparat, so dass eine standardisierte Auswertung nicht möglich wäre. Die in dieser Färbung sehr starke Hintergrundfärbung erschwert zudem die Zählung. Trotz des Nachteils, dass kleine Kapillaren nicht erfasst werden, erwies sich die α -sma-Färbung als zuverlässig. Es traten keine Präparat-individuellen Unterschiede in der Anfärbung der Gefäße auf. Bei allen Präparaten erfolgte die Anfärbung der Gefäße gleichermaßen. Aber auch hier färbten sich nicht alle Gefäße, die glatte Muskelzellen aufwiesen, deutlich positiv. Bei der Identifizierung schwach positiv gefärbter Gefäße traten somit interindividuelle Unterschiede auf. Die Anzahl nicht gefärbter Gefäße wird in der Literatur mit unter 10 % angegeben (Lienau et al., 2005).

- **Osteoklastenzählung**

Die Darstellung der Osteoklasten beruht auf der Anfärbbarkeit der lysosomenständigen Tartrat-resistenten sauren Phosphatase. Als Osteoklasten wurden alle Zellen gewertet, die sich in der TRAP-Färbung rosa anfärbten, mindestens zwei Zellkerne aufwiesen und in Kontakt zu einer knöchernen Oberfläche standen (Schell et al., 2006). Die Zählung erfolgte periostal, endostal und kortikal. Die Verteilung der Osteoklasten wurde angegeben als Anzahl der Osteoklasten pro Quadratmillimeter Knochen (OC/mm²) in der jeweiligen ROI (modifiziert nach Schell et al., 2006). Die Osteoklasten ließen sich in Vorversuchen nicht in PMMA eingebetteten Knochen darstellen. Die Zählung erfolgte deshalb an in Paraffin eingebetteten Präparaten. Die knöcherne Oberfläche, auf die sich die Osteoklastenzahl bezieht, musste ebenfalls an einem in Paraffin eingebetteten und entkalkten Präparat bestimmt werden. Das erwies sich zum einen als sehr zeitaufwendig und hatte zum anderen den Nachteil, dass die Verteilung der Osteoklasten nicht auf die mineralisierte knöcherne Fläche, sondern auf die knöcherne Fläche bezogen musste. Da die Digitalisierung der Präparate aufgrund der für die Zählung erforderlichen Vergrößerung nicht möglich war, erfolgte eine manuelle Zählung unter dem Lichtmikroskop in 40facher Vergrößerung. Für die Definition der Höhe der ROI wurde eine sieben Millimeter hohe Schablone verwendet, welche in der Mitte eine Markierung für die Osteotomiespaltmitte aufwies. Da die manuelle Zählung Fehlerquellen birgt, erfolgte die Dreifachzählung der Knochen resorbierenden Zellen. Eine mögliche Fehlerquelle lag in der Festlegung der ROI-Höhe. Das Plexiglas war leicht verschieblich, da es nicht fixiert werden konnte. Auch schwach angefärbte Zellen mussten als Osteoklasten erkannt werden. Die schwache Anfärbung lässt sich zum einen durch die unterschiedliche Aktivität der sauren Phosphatase und damit verbundenen unterschiedlichen Signalsintensität erklären. Die Intensität der Anfärbung war aber innerhalb eines Präparates ähnlich. Eine weitere Erklärung für eine schwache Anfärbung ist eine mögliche Hitzeinstabilität des Enzyms. Während der Einbettung werden Temperaturen von bis zu 60 °C erreicht, die zu einer Denaturierung des Enzyms führen könnten. Die Präparate lagen vor der Einbettung ebenfalls kurze Zeit in Paraffin, waren zu diesem Zeitpunkt allerdings noch mit einer Mullbinde umwickelt. Unterschiedlich dicke Lagen dieser Mullbinde würden entsprechend zu unterschiedlich hohen Temperaturen in den jeweiligen Knochen führen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Wie dem Stand der Wissenschaft zu entnehmen ist, finden sich bei 10-20 % aller Frakturen Heilungsstörungen (Haas, 2000). Atrophe Pseudarthrosen, als eine sehr schwerwiegende Form der Knochenheilungsstörung, stellen Chirurg und Patient vor eine oft langwierige und nicht immer erfolgreiche Therapie. Häufig sind Verfahrenswechsel des Osteosynthesystems, Spongiosaanlagerungen oder der Einsatz von Knochenersatzmaterialien erforderlich (Einhorn, 1995; Jones et al., 2005). Diese Methoden sind jedoch nur symptomatisch und verlaufen nicht immer komplikationslos (Hernigou et al., 1997). Sie stellen für den Patienten oft eine erhebliche physische und psychische Belastung dar. In der letzten Dekade wurden in tierexperimentellen Studien *in vitro* vermehrte mesenchymale Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien in Knochendefekte implantiert. In diesen Studien konnte ein Fortschreiten der Heilung im Vergleich mit den nur mit Ersatzmaterialien behandelten Defekten festgestellt werden (Kon et al., 2000; Petite et al., 2000). Vor diesen Hintergründen wurde die Auswirkung der Applikation autologer mesenchymaler Stammzellen auf die Heilung einer atrophen Pseudarthrose zum Zweiwochenzeitpunkt radiologisch, histologisch und histomorphometrisch mit dem Ziel untersucht, Aussagen über die Effekte dieser möglichen Therapieform zu treffen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob sich das Periost, als essentielles Element der Knochenheilung (Ozaki et al., 2000), selbst regeneriert, bevor eine periostale Kallusbildung stattfindet. Aussagen sollen darüber getroffen werden, ob die applizierten Zellen zur periostalen Rekonstruktion beitragen.

5.2.1 Röntgenbilder

Die Tiere beider Gruppen zeigten zwei Wochen nach der Osteotomie kein radiologisches Zeichen einer beginnenden Überbrückung der Osteotomiezone. Ein röntgenologischer Hinweis, wie bei physiologisch ablaufender Knochenheilung zu beobachten, fehlte in beiden Gruppen. Weder periostal, endostal oder kortikal zeigten sich im unmittelbaren Bereich der Osteotomie und der Kauterisierung röntgendichte Verschattungen. Der Osteotomiespalt war immer deutlich. Radiologisch unterschieden sich die Gruppen nicht in ihrem im Heilungsverlauf.

Mineralisiertes Gewebe lässt sich radiologisch erst ab einer Dichte von 30 % darstellen (Radasch, 1999). In den Bereichen, in dem das Periost nicht durch Kauterisierung thermisch zerstört wurde, zeigten sich periostal in beiden Gruppen wolkenähnliche, röntgendichte Verschattungen. Knöchernes Kallusgewebe stellt sich demnach bereits zu einem recht frühen

Zeitpunkt bei der Ratte radiologisch dar. Der knöchernen Kallus muss also zu diesem Zeitpunkt eine entsprechende Dichte aufgewiesen haben, reichte aber nicht bis in den Bereich der thermischen Deperiostierung. Auch endostal ließ sich kein überbrückender mineralisierter Kallus darstellen.

Radiologische Charakteristika atropher Pseudarthrosen stellen mangelnde periostale und endostale knöchernen Kallusbildung sowie die Abrundung der Fraktur- bzw. Osteotomieenden mit Erweiterung des Osteotomiespaltes dar (Frost, 1989; Jones et al., 2005; Rüter et al., 1999). Die Atrophie der Kortikalisenden mit Erweiterung des Osteotomiespaltes konnte anhand der vorliegenden Röntgenbilder nicht festgestellt werden. Die Abrundung der avitalen Enden erfolgt allein durch osteoklastische Aktivität. Wie die histologischen Bilder beweisen, fanden sich an den Kortikalisrändern des Osteotomiespaltes nur vereinzelt aktiv resorbierende Osteoklasten. Der Spalt stellte sich radiologisch und histologisch scharfkantig dar. Es kann spekuliert werden, dass die Abrundung der Kortikalisfragmente zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt kann nicht von einer atrophen Pseudarthrose, wohl aber von einer Heilungsstörung gesprochen, die sich in beiden Gruppen entwickelte, da die für atrophe Pseudarthrosen charakteristische, radiologisch sichtbare Fragmentabrundung noch nicht stattfand. Gleichzeitig ließ sich aber auch kein knöchernes röntgendichtes Kallusgewebe im Bereich der Osteotomie nachweisen, welches bei physiologisch ablaufender Heilung zu diesem Zeitpunkt bei der Ratte bereits nachzuweisen wäre (Kokubu et al., 2003;).

5.2.2 Histologie und Histomorphometrie

Insgesamt zeigte die Applikation der mesenchymalen Stammzellen zum Zweiwochen-Zeitpunkt nicht den erhofften Effekt. Die Heilung der Tiere, die eine Stammzellinjektion erhielten, war nicht fortgeschrittener als die derjenigen Tiere, deren Osteotomie unbehandelt blieb.

Beide Gruppen zeigten mikroskopisch das Bild einer verzögerten Knochenheilung. Eine exakte zeitliche Einteilung gestaltete sich jedoch schwer. Die Resorption des Frakturhämatoms war bei den meisten Tieren abgeschlossen. Im Bereich der Deperiostierung, der Knochenmarksentnahme und im Osteotomiespalt dominierte fibrotisches Gewebe. Eine weitere Differenzierung in ossäres, chondräres oder fibrocartiläres Gewebe, welche unter physiologischen Umständen zu diesem Heilungszeitpunkt bereits erfolgt (Kokubu et al., 2003; Remedios, 1999), unterblieb meist auch in der MSC-Gruppe. An den unversehrt gebliebenen Bereichen hob sich das Periost durch knöchernen Kallusbildung via desmale Ossifikation von

der darunter liegenden Kortikalis ab. Auch endostal synthetisierten Osteoblasten in einiger Entfernung zur Osteotomie knöchernes Kallusgewebe. Der periostale und endostale knöcherne Kallus bestand zum Zweiwochenzeitpunkt aus Geflechtknochen, der im Gegensatz zum Lamellenknochen eher ungeordnet erschien (McKibbin, 1978).

Die Osteotomiezone stellte sich bei beiden Gruppen relativ einheitlich dar. Einzig die Ausprägung und Zusammensetzung des periostalen Kallus ließen Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Histomorphometrisch war die periostale Kallusfläche in der MSC-Gruppe größer, unterschied sich statistisch jedoch nicht von der der Medium-Gruppe. Die MSC-Tiere bildeten im periostalen Kallus quantitativ mehr Knochen ($p < 0,01$), mineralisiertes Gewebe ($p = 0,02$) und mehr Knorpel ($p = 0,02$), aber auch eine deutlich größere Bindegewebsfläche ($p = 0,01$). Da die Kallusflächen individuell unterschiedlich groß ausgebildet waren, wurden zum objektiveren Vergleich der Ergebnisse die absoluten Flächen auf die Gesamtfläche des Kallus bezogen. So betrachtet, relativierten sich die Unterschiede. Signifikante Unterschiede kristallisierten sich in keinem der histomorphometrisch analysierten Gewebeanteile heraus.

Das Gewebe im deperiostierten Bereich differenzierte sich bei den MSC-Tieren subjektiv häufiger zu Knorpel. Diese Beobachtung wurde durch den Nachweis des Kollagen-II-Antigens untermauert. Der Anteil Kollagen-II positiv gefärbter Areale am periostalen Kallus war in der MSC-Gruppe höher. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden im Gruppenvergleich jedoch nicht. Der Kollagen-II-Anteil des medialen periostalen Kallus der MSC-Tiere lag mit 2,7 % über dem des lateralen periostalen Kallus mit 1,6 %. Die histomorphometrische Analyse der unentkalkten Präparate des lateralen und medialen periostalen Kallus zeigte deutlich, dass sich das periostale Kallusgewebe in der MSC-Gruppe nur auf der medialen Seite zu Knorpel differenzierte. Auf der lateralen Seite dieser Gruppe bildete sich ebenso wenig Knorpel wie in der Medium-Gruppe. Der Median dieser Seite lag in beiden Gruppen absolut [mm^2] und relativ [%] bei 0. Die in der deskriptiven Histologie gemachten Beobachtungen ließen sich somit auch histomorphometrisch bestätigen.

Der Knorpel bildete sich direkt an der Front des knöchernen Kallus im deperiostierten Bereich, erreichte den Osteotomiespalt aber nie. Bei den Medium-Tieren blieb die Differenzierung des periostalen Gewebe im gekauterten Bereich häufiger auf der Stufe des Bindegewebes. Die Bildung von Knorpel kann nur in biologisch aktivem Gewebe erfolgen. Demnach war das biologische Potential der medialen Seite der Femora der MSC-Tiere weniger stark eingeschränkt als das der lateralen Seite. Dies ließ sich durch den höheren, Kollagen-II-Anteil darstellen, welcher jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im

Vergleich zu Medium-Gruppe aufwies, sowie durch die signifikant größere Knorpelfläche in der Safranin O/von Kossa-Färbung. Im biologisch inaktiven Gewebe erfolgt keine weitere Differenzierung des primitiven Bindegewebes zu höher differenzierten Knochen oder Knorpel.

Die chondrogene Differenzierung des periostalen Kallusgewebes auf der medialen und nicht gleichzeitig auch auf der lateralen Seite lässt sich nicht eindeutig erklären. Es existieren verschiedene Möglichkeiten. Die exakte Applikation der mesenchymalen Stammzellen in Markraummitte gelang wahrscheinlich nicht immer. Die Zellen wurden bei den Tieren, die dieses Knorpelkappen aufweisen, möglicherweise, anstelle in Markraummitte, medial der Osteotomie injiziert. Da sich die Tiere bei der Stammzellinjektion in Seitenlage befanden, ist es möglich, dass die Zellen im Zuge der Injektion nach medial gedrängt wurden und deshalb dort ein Fortschreiten der Gewebsdifferenzierung stattfand. Die entkalkten und in Paraffin eingebeteten Knochen der MSC-Tiere zeigten im medialen periostalen Kallus eine signifikant geringere Gefäßdichte. Da bei den histomorphometrisch untersuchten Knochen die Bestimmung der Gefäßdichte methodisch nicht möglich war, kann hier nur spekuliert werden, dass diese MSC-Tiere im medialen periostalen Kallus eine ebenso geringere Gefäßdichte aufweisen wie die MSC-Tiere, deren Gefäßdichte immunhistologisch erfasst wurde.

Es existieren mehrere Faktoren, die die Bildung von Knorpel während der Frakturheilung fördern. Knorpel bildet sich dort, wo Blut- und damit Sauerstoffversorgung reduziert sind (McKibbin, 1978; Willenegger et al., 1971). Mesenchymale Stammzellen differenzieren sich nach der Transplantation in ein sauerstoffarmes Milieu in eine chondrogene Richtung (Bianco et al., 2001). Entsprechend der geringeren Gefäßdichte im medialen periostalen Kallus der MSC-Gruppe muss von einem sauerstoffärmeren Milieu, zumindest im Vergleich zur lateralen Seite, ausgegangen werden. Die applizierten mesenchymalen Stammzellen könnten sich deshalb in die chondrogene Richtung differenziert haben. Da eine höhere Sauerstoffversorgung die Differenzierung der MSCs in eine osteoblastären Richtung fördert (Bianco et al., 2001; Caplan, 1991) und die Gefäßdichte der lateralen Seite verglichen mit der medialen Seite dieser Gruppe höher war, müssten die applizierten Zellen, vorausgesetzt, sie erzielten einen Effekt, zur Osteogenese beitragen. Es hätte sich auf der medialen Femurseite im Vergleich zur Medium-Gruppe, die lateral eine ähnlich hohe Gefäßdichte zeigten, deutlich mehr mineralisiertes Kallusgewebe entwickelt. Der Kallus der MSC-Tiere wies mit 23,4 % einen ähnlich großen Anteil an mineralisierter Fläche auf wie der Medium-Gruppe mit 20,9 %. Die Zellen erzielten, zumindest im lateralen periostalen Kallus, keinen die Heilung unterstützenden Effekt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass neben einer niedrigen Sauerstoffspannung (McKibbin, 1978) ebenso eine höhere Scherbewegung die Bildung knorpeliger Kallusanteile triggert (Probst et al., 1997). Bei einem monolateral montierten Fixateur externe ist Fixateur-fern (in diesem Model medial) von einer höheren Scherbewegung auszugehen. Da die laterale Fixateur-Montage auch in der Medium-Gruppe erfolgte, kann die Scherbewegung allein nicht als Ursache für das größere Knorpelaufkommen verantwortlich gemacht werden. Entgegen der hier präsentierten Ergebnisse müsste dann auch in dieser Gruppe der Kallus einen größeren Knorpelanteil aufweisen. Zudem war der in diesem Modell gewählte Fixateur sehr steif, so dass die auftretenden Scherbewegungen ohnehin sehr gering waren. Es ist also vielmehr wahrscheinlich, dass das sauerstoffärmere Milieu auf der medialen Seite die Differenzierung der Stammzellen in eine chondrogene Richtung förderte.

Die histomorphometrisch bestimmte Fläche des periostalen Kallus war in der MSC-Gruppe zwar nicht signifikant, aber dennoch größer als in der Medium-Gruppe. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Gewebeanteile war bei beiden Gruppen dennoch ähnlich. Der Bindegewebsanteil in der MSC-Gruppe lag mit über 50 % ähnlich hoch wie der der Medium-Gruppe. Die qualitative Zusammensetzung des periostalen Kallus unterschied sich im Gruppenvergleich nicht. Verglichen mit der lateralen Seite zeigte der mediale Kallus einen geringeren Bindegewebsanteil und einen höheren Anteil mineralisierter Knochenfläche. Letztgenannter wies demnach eine qualitativ höherwertige Zusammensetzung auf, wenngleich diese zwischen den Gruppen homogen war.

Ein knöcherner Kallus bildete sich überall dort, wo die Heilung unbeeinflusst blieb. Hier fanden sich zahlreich aktiv synthetisierende Osteoblasten. Die hohe Osteoklastendichte beider Gruppen deutet darauf hin, dass der Kallus in dieser frühen Phase bereits remodelierenden Prozessen unterlag. Schell und Kollegen (2006) gehen mit dieser Annahme konform. Sie fanden in einer Schafsstudie in der frühen Phase der Heilung die höchste Osteoklastendichte im periostalen Kallus. In der vorliegenden Studie besaß der endostale Kallus die höchste Osteoklastendichte. Resorption und Remodeling des endostalen knöchernen Kallus scheint hier zum frühen Zeitpunkt eine hohe Priorität zu besitzen. Schell und Mitarbeiter geben an, dass das hohe endostale Osteoklastenaufkommen in regulär ablaufender Heilung die Wiederherstellung der Durchgängigkeit der Markhöhle als Versorgungskompartiment des Knochens zum Ziel hat. Dies erscheint in der vorliegenden Studie umso wichtiger, da durch

die Zerstörung der Knochenhaut eine effektive Unterstützung der Versorgung des Knochens durch periostale Gefäße (Rhineland, 1974), zumindest im gekauterten Bereich, unterblieb.

Der endostale knöcherne Kallus entwickelte sich in beiden Gruppen zwischen den gegenüberliegenden Kortizes. Dieser dichtete, mit Ausnahme eines Medium-Tieres, den Markraum vollständig ab, jedoch ohne den Osteotomiespalt zu überbrücken. Harrison et al. (2003) und Volpon (1994) beobachteten die knöcherne Markraumabdichtung auch noch nach fünf Wochen resp. sechs Monaten. In beiden Modellen stellte sich der endostale knöcherne Kallus als dünnes Osteotomiespalt-nahes Band zwischen den gegenüberliegenden Kortizes dar. In der vorliegenden Studie zeigte der endostale Kallus eine ebensolche Tendenz. Es kann gemäß den Modellen von Harrison und Volpon davon ausgegangen werden, dass der Kallus auch weiterhin remodelierender Resorption unterliegen wird. Die Osteotomiezone könnte, analog der Beobachtungen in einem 3 mm Defekt-Modell der Ratte (Cullinane et al., 2002), nach Abrundung der Kortikalisenden und remodelierender Resorption des endostalen Kallus, die Morphologie eines Fehlgelenkes annehmen.

Anhand der histomorphometrisch erhobenen Daten wird deutlich, dass ein Effekt der applizierten autologen mesenchymalen Zellen auf die endostale Knochenheilung zum Zweiwochenzeitpunkt unterblieb. Weder absolut noch relativ unterschied sich die Zusammensetzung des endostalen Kallus zwischen den Gruppen. Die Gewebequalität des Kallus erscheint in der Medium-Gruppe mindestens gleichwertig zu sein. Der Bindegewebsanteil der MSC-Gruppe lag im Median sogar geringfügig über dem der Medium-Gruppe, der Anteil mineralisierten Knochens unter dem der Medium-Tiere.

Histomorphometrisch konnte bestätigt werden, dass fibrotisches Gewebe den Osteotomiespalt vollständig ausfüllte. Dieses Gewebe verband zwar die kortikalen Fragmente, führt aber nicht zu ausreichender Stabilität (Boyan et al., 1999). Knorpel und Kollagen-II ließen sich in beiden Gruppen weder histologisch noch histomorphometrisch darstellen. Enchondrale Ossifikation, die unter physiologisch ablaufender Heilung in diesem Gebiet auftritt (Ozaki et al., 2000; Simmons, 1985), war hier in keiner der beiden Gruppen festgestellt worden. Eine Differenzierung der direkt in den Osteotomiespalt injizierten mesenchymalen Stammzellen in funktionelles Gewebe unterblieb. Die Zellen erzielten direkt am Ort der Applikation nicht den erhofften Effekt. Auf mögliche Ursachen des Ausbleibens des gewünschten Effektes der mesenchymalen Stammzellen wird auf Seite 140 eingegangen.

Die Kortikalis bestand aus Lamellenknochen. Ihre Oberfläche zeigte sich in beiden Gruppen meist glattrandig bzw. durch knöcherne Kallusauflagerungen wellenförmig. Durch Osteoklasten hervorgerufene Resorption fand sich selten. Dieses Bild wurde durch die geringe kortikale Osteoklastendichte bestätigt. Kokubu (2003) beschreibt in seinem Pseudarthrose-Modell das verstärkte Aufkommen resorbierender Osteoklasten an den Kanten der Osteotomie und damit einhergehend, eine Abrundung der Kortikalisenden. Dieses Phänomen ist typisch für atrophe Pseudarthrosen (Kokubu et al., 2003; Volpon, 1994). Die kortikalen Osteotomiespaltkanten in der vorliegenden Studie stellten sich in beiden Gruppen immer glattrandig dar (eine Ausnahme bildete ein MSC-Tier), der Spalt war nie erweitert. Die Osteozytenlakunen der deperiostierten Kortikalis waren entweder leer oder enthielten degenerierte Osteozyten, die durch Deperiostierung und Osteotomie von ihrem Versorgungskompartiment getrennt wurden und abstarben (Cruess et al., 1975). Diese Beobachtungen stimmen daher nicht mit denen von Kokubu gemachten überein, der angibt, dass die thermische Deperiostierung nicht zu einer tiefen kortikalen Nekrose führt. Im Zuge der Heilung wird versucht, dieses avitale Knochengewebe abzubauen und durch vitalen Knochen zu ersetzen (Braun et al., 1996; Cruess et al., 1975; Frost, 1989). Da die applizierten MSCs die Knochenheilung nicht effizient unterstützten, bestand infolge Deperiostierung und Knochenmarksentnahme ein Missverhältnis zwischen Knochen-resorbierenden Osteoklasten und Knochen-aufbauenden Osteoblasten (Kokubu et al., 2003; Marsh et al., 1999). Der avitale Knochen wird künftig zwar abgebaut, jedoch nicht wieder ersetzt werden. Im Pseudarthrose-Modell von Harrisson und Mitarbeiter (2003) fand die Abrundung der osteotomierten Kortikalisenden zwischen der dritten und fünften Woche post OP statt. Die Erweiterung des Osteotomiespalt durch kortikale Resorption findet im vorliegenden Modell wahrscheinlich zu einem späteren Zeitpunkt statt, setzte bei einem Tier aber bereits zum Zweiwochenzeitpunkt ein.

Es ist allgemein bekannt, dass atrophe Pseudarthrosen unter anderem auf eine Störung der Vaskularität zurückzuführen sind (Stürmer, 1996; Runkel et al., 2000). In der vorliegenden Studie konnte sowohl periostal als auch endostal in beiden Versuchsgruppen eine hohe Gefäßdichte nachgewiesen werden. Volpon führt in seinem caninen Modell die Entstehung der atropen Pseudarthrose nicht auf eine gestörte Vaskularisierung zurück. Auch er wies zum frühen Zeitpunkt eine hohe Gefäßdichte nach. Es konnte im vorliegenden Modell klar gezeigt werden, dass sich unter den zahlreichen Gefäßen nur wenig große Gefäße befanden. Wie hier, so auch im Modell von Volpon, handelte es sich um kleine, ungeordnet

erscheinende Gefäßzweige. Entgegen der Meinung von Volpon erschien die Blutversorgung für die Heilung trotz der hohen Gefäßdichte in der hier präsentierten Studie nicht adäquat genug. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass sich Endothelzellen und Perizyten der Kapillaren des periostalen Kallus in der frühen Phase der Frakturheilung zunächst zu mesenchymalen Zellen und anschließend zu Vorläufern der knochen- und knorpelbildenden Zellen transformierten (Brighton et al., 1997). Inwieweit und ob eine Transformation mesenchymaler Stammzellen in Endothelzellen der Kapillaren möglich ist, ist nicht bekannt. Die Medium-Gruppe wies im Median zwar eine höhere Gefäßdichte auf, jedoch ohne sich statistisch signifikant von der MSC-Gruppe zu unterscheiden. Die Applikation der Stammzellen hatte demnach im vorliegenden Modell keinen Einfluss auf die Bildung neuer Gefäße. Im periostalen Bereich lag die Gefäßdichte trotz Deperiostierung höher als endostal, da nicht nur vom Periost selbst, sondern auch von der umliegenden Muskulatur Gefäße in das Osteotomiegebiet einsprießen (Cruess et al., 1975).

Der Osteotomiespalt, als eine Teilfläche der periostalen und endostalen ROI, wies die höchste Gefäßdichte auf. Aber auch in diesem Gebiet zeigten sich keine signifikanten gruppenabhängigen Unterschiede. Das unterstützt die Aussage, dass die applizierten Zellen keinen Einfluss auf die Bildung neuer Gefäße nahmen. Die hohe Gefäßdichte kam mitunter dadurch zustande, dass viele Gefäße innerhalb einer sehr kleinen Bindegewebsfläche (unter 1 mm²) gezählt werden konnten. Wurde die Zahl der Gefäße auf einen Quadratmillimeter Bindegewebsfläche bezogen, ergab so sich eine sehr hohe Gefäßdichte.

Ozaki und Mitarbeiter (2000) bemerkten in einem Frakturmodell der Ratte zwei Wochen nach Entfernung der Knochenhaut die Bildung fibrösen Gewebes, ähnlich dem des Periosts, auf der Oberfläche des Kallus. In der vorliegenden Studie lag über dem periostalen Kallus ebenfalls eine Schicht aus dicken Bindegewebsfasern. Diese Fasern verjüngten sich im deperiostierten Bereich oder zogen über den Osteotomiespalt. Es könnte sich dabei um den Versuch handeln, biomechanische herrschende Kräfte zwischen den Fragmenten zu kompensieren, um so der Osteotomie aufgrund mangelnder knorpeliger oder knöcherner Überbrückung zumindest etwas Stabilität zu verleihen. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass diese Fasern das Stratum fibrosum des Periosts repräsentieren. Diese Schicht hat sich, zwar noch sehr dezent, auch im gekauterten Bereich unabhängig des zum Periost gehörigen Stratum cambium entwickelt. Unter der Faserschicht fand sich hier, anders als im nicht gekauterten Bereich, keine zellreiche mehrreihige Schicht osteoblastenähnlicher Zellen, welche als Stratum osteogenicum angesehen werden kann. Die oseogene Schicht konnte nur auf der Oberfläche

des hartgewebigen Kallus beobachtet werden. Diese Beobachtung geht auch mit der von Ito (2000) gemachten Anmerkung konform. Er gibt an, dass das Stratum fibrosum zur Regeneration befähigt ist, das Stratum cambium jedoch nicht. Hätte sich das Periost im deperiostierten Bereich vollständig regeneriert, wäre hier mit einer weit fortgeschritteneren Heilung zu rechnen gewesen. Eine Knochenheilung ohne Cambiumschicht ist jedoch nicht möglich (Ito et al., 2001).

Die histologischen Bilder des hier vorgestellten Modells geben insoweit Aufschluss, als dass eine vollständige periostale Rekonstruktion nur im Zuge der externen knöchernen Kallusbildung erfolgen kann und nicht unabhängig von dieser auftritt. In der physiologisch ablaufenden, ungestörten Heilung ist die Integrität der Knochenhaut, wenn überhaupt, dann nur im Bereich der Osteotomie bzw. Fraktur unterbrochen. Mit Einigung der periostalen Kalli der gegenüberliegenden Fragmente über dem Spalt muss es auch zur Vereinigung der periostalen Schichten beider Knochenfragmente kommen. Die vollständige periostale Rekonstruktion während der Knochenheilung scheint also an die knöcherne Kallusbildung gebunden zu sein. Ist das Periost geschädigt, so wird die Kallusbildung inkomplett (Stürmer, 1996; Yoo et al., 1998). Ohne knöchernen Kallus unterbleibt jedoch die Fragmentvereinigung und damit die vollständige Rekonstruktion des Periosts. In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass eine vollständige periostale Regeneration unterbleibt, das Stratum fibrosum jedoch unabhängig des Stratum cambium in der Lage ist, zu regenerieren. Weitere Erkenntnisse darüber, ob sich das Periost selbst regenerieren kann, könnten in Studien gewonnen werden, in denen die Knochenhaut entfernt, aber kein Stimulus in Form einer Fraktur, Osteotomie oder Pin-Implantation gesetzt wird, so dass dadurch die Kallusbildung so weit als möglich unterbleibt.

Obwohl die im Periost residierenden Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* ein osteogenes (Arnold et al., 2002; Breitbart et al., 1998; Redlich et al., 1999; Vögelin et al., 2000; Takushima et al., 1998) und chondrogenes Differenzierungspotential (Nakahara et al., 1990; Ito et al., 2001) aufweisen, ist bis heute nicht vollständig geklärt, dass diese Zellen mesenchymalen Ursprungs sind. Es besteht daher insoweit Aufklärungsbedarf, ob Stammzellen des Knochenmarks überhaupt zur Rekonstruktion der Cambiumschicht fähig sind. An dieser Stelle kann dokumentiert werden, dass die applizierten Stammzellen keinen Einfluss auf die vollständige Regeneration des Periosts nehmen. Auch an der Bildung des Stratum fibrosum scheinen sie keinen Anteil zu haben, da es sich im deperiostierten Bereich auch in der Gruppe entwickelte, die keine Stammzellinjektion erhielt.

Histologisch zeigten sich zwei unerwartete Auffälligkeiten. Zum einen fielen Unterbrechungen der kortikalen Kontinuität durch amorph erscheinende, nicht knöcherne Areale auf. Diese Beobachtungen konnten in allen histologischen Färbungen gemacht werden. Sie waren in der Movat Pentachrom-Färbung meist grün, in der Alcian Blau-Färbung leuchtend blau und in der Kollagen-II-Färbung ebenso positiv (rosa) wie der Knorpel des periostalen Kallus gefärbt. Diese Färbeergebnisse deuten auf das Vorkommen von Knorpel in den lakunenartigen Unterbrechungen der Kortikalis hin. Die Annahme wurde durch eine Negativkontrolle der Kollagen-II-Färbung untermauert, in denen sich diese Areale nicht positiv anfärben ließen. Zellen wurden in diesen Bereichen auffallend selten beobachtet. Waren sie vorhanden, so zeigten diese meist eine osteozytenähnliche Morphologie. Einige der Kontinuitätsunterbrechungen enthielten aber auch chondrozytenähnliche Zellen. Osteoklasten, die durch Resorption diese Lakunen erzeugen könnten, waren nie präsent. In der Movat Pentachrom-Färbung konnte in einigen der Lakunen eine beginnende Vergelbung der amorph erscheinenden Grundsubstanz nachgewiesen werden. Die Vergelbung gibt den Hinweis auf eine beginnende Kalzifizierung. Um festzustellen, ob diese Auffälligkeit femurspezifisch war, wurden die Tibiae der Ratten untersucht. Auch hier gab es solche Areale. Ratten, denen im Rahmen des Gesamtprojektes eine achtwöchige Standzeit erlaubt war, zeigten ebenso diese Areale wie auch Tiere, die einer physiologischen Knochenheilung unterliefen. Um auszuschließen, dass dieses Phänomen nur bei den im Rahmen dieses Projektes verwendeten Ratten, eventuell als Artefakt im Zuge der Aufarbeitung der Präparate, auftrat, wurden Femora und Tibiae von Ratten andere Projekte untersucht. Auch hier wurde diese Auffälligkeit festgestellt. Trotz intensiver Literaturrecherche fand sich nur eine Publikation, die ein ähnliches Phänomen beschreibt. Erben (1996) berichtet über kalzifizierte Knorpelkerne im Knochen adulter Ratten, die im Zusammenhang mit remodelierenden Prozessen auftreten. Im Rahmen des Remodelings der Ratte folgt der Knochenresorption nicht unmittelbar Knochenaufbau (Erben, 1996). Das würde in der vorliegenden Studie die Abwesenheit knochenresorbierender Osteoklasten und das Fehlen knochenaufbauender Osteoblasten erklären, nicht jedoch die Hypozellulärität dieser Areale bei allen untersuchten Knochen. In den kortikalen Unterbrechungen fanden sich nur vereinzelt osteozyten- und chondrozytenähnlich Zellen. Demnach unterscheidet sich das Remodeling im Knochen adulter Ratten von dem anderer Säugetiere, bei denen der Resorption unmittelbar Knochenaufbau folgt (Frost, 1989). Sollte es sich um remodelierende Prozesse handeln, so verläuft das Remodeling des Rattenknochens, anders als bei anderen Säugetieren, über eine knorpelige Zwischenstufe. Ob und inwieweit das hier beschriebene Phänomen analog der von

Erben gemachten Beobachtung ist, ist aus seiner Publikation nicht ersichtlich. Jedoch ist bekannt, dass die Röhrenknochen der Ratten ein lebenslanges Wachstum zeigen (Harrison et al., 2003). Daher ist nicht auszuschließen, dass es sich um Wachstumsartefakte handelt, die auch in Diaphysenmitte auftreten. An dieser Stelle kann nur gesagt werden, dass die gemachte Beobachtung rattentypisch ist und auch in anderen Knochen dieser Tiere vorkommt. Für eine genaue Erklärung der Zusammensetzung und der Bedeutung bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

Das zweite unerwartete Ereignis stellten intramedulläre zystoide Strukturen in Osteotomiespaltmitte dar. Sie traten bei drei Tieren der Medium- und vier Tieren der MSC-Gruppe auf. Die darin enthaltenen Zellen waren deutlich größer als Erythrozyten und nur blass angefärbt. Sie wiesen Veränderungen in Form von Zellkerndegeneration und -verlust auf. Aufgrund der schwachen Anfärbung und der Veränderungen war eine morphologische Zuordnung der Zellen nicht möglich. Blutgefäße waren in den kapselartigen Strukturen nie vorhanden. Die Zellen wurden vermutlich von ihrer Versorgung abgeschnitten und degenerierten. Da die Strukturen auch bei den Medium-Tieren degenerierte Zellen enthielten, kann angenommen werden, dass es sich nicht um die applizierten MSCs handelt. Mit Ausnahme vereinzelt randständig auftretender Lymphozyten waren andere inflammatorische Zellen nie präsent. Eine septische oder aseptische Entzündung lag demnach nicht vor. Ebenso wenig handelte es sich um Hämatomreste, da diese histologisch eindeutig von den Strukturen abgrenzbar waren. Bei mikroskopischer Untersuchung der Femora von Ratten mit einer achtwöchigen Standzeit, die ebenfalls eine MSC- bzw. Medium-Injektion erhielten, konnten die Strukturen nicht dargestellt werden. Aufgrund der hohen Prävalenz zum Zweiwochenzeitpunkt kann davon ausgegangen werden, dass die zystoiden Erscheinungen auch bei den Tieren mit längerer Standzeit auftraten, zum späteren Zeitpunkt aber bereits resorbiert waren. Demnach erfolgt eine stetige Revaskularisierung dieser endostalen Bereiche zu einem späteren Zeitpunkt. Die Reaktion trat auch bei Tieren der Medium-Gruppe auf, also bei denjenigen, denen keine autologen mesenchymalen Stammzellen, sondern nur das Anzuchtmedium injiziert wurde. Es kann nur spekuliert werden, dass die beschriebenen Strukturen eine Reaktion auf die Medium- resp. Zell-Medium-Injektion darstellten und nicht etwa eine Abwehrreaktion auf die applizierten MSCs. Takushima et al. (1998) sowie Shao und Mitarbeiter (2007) injizierten in ihren Kaninchenmodellen den Kontrollgruppen anstelle *in vitro* vermehrter Zellen ebenfalls das Kultivierungsmedium. Das in diesen Studien verwendete Medium entsprach in seiner Zusammensetzung dem des vorgestellten Modells. In

ihren Publikationen lassen sich keine Hinweise auf die hier beschriebene Reaktion finden. Das in dieser Studie verwendete Kultivierungsmedium entspricht in seiner Zusammensetzung dem in anderen Forschungseinrichtungen verwendeten Medium (Bruder et al., 1998; Jaiswal et al., 1997). Da die Zellen während der Kultivierungsphase bis zur Transplantation expandierten, kann das Kultivierungsmedium, zumindest *in vitro*, keinen vitalitätshemmenden Effekt auf die Zellen ausüben.

Mögliche Ursachen des Ausbleibens der Knochenheilung im vorgestellten Modell sind vielseitig und nicht allein auf ein Versagen der Stammzellen zurückzuführen. Zahlreichen Studien bestätigen das *in vivo* osteogene Potential *in vitro* expandierter mesenchymaler Stammzellen (Yoo et al., 1998).

Es ist bereits bekannt, dass das Hämatom durch die Aussendung von Mediatoren ein osteogenes Potential besitzt (Probst et al., 1997) und somit essentiell für die Frakturheilung ist. Es bildet sich unmittelbar nach Auftritt der Fraktur und wird während der ersten Wochen allmählich resorbiert (McKibbin, 1978). Grundnes und Kollegen (1993) wiesen die Folgen der Hämatomentfernung unmittelbar nach der Osteotomie, zwei Tage und vier Tage post operationem nach. Die Knochenheilung blieb durch die Entfernung des Hämatoms unmittelbar post OP unbeeinflusst, während sie bei Entnahme zwei bzw. vier Tage post OP beeinträchtigt wurde. Während das sehr frühe Hämatom schnell nachgebildet wird und so der Heilung mit seinen Mediatoren wieder zur Verfügung steht, ist das spätere Hämatom bereits organisiert und kann in dieser Qualität nicht wieder erneuert werden. Mit der Entfernung des Hämatoms zum späteren Zeitpunkt entfällt auch der osteogene Stimulus (Grundnes et al., 1993). Die histologischen Bilder im vorliegenden Modell zeigen zwei Wochen nach der Osteotomie noch Hämatomreste. Ein Verdrängen oder Ausschwemmen durch die Injektion des Mediums (einschl. der MSCs) aus dem Osteotomiebereich ist daher unwahrscheinlich, eine Schädigung und damit eine Reduktion oder ein Wegfall der die Knochenheilung stimulierenden Faktoren kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Auf den vermutlich geringen, die Zellvitalität hemmenden Einfluss des Mediums wurde bereits eingegangen. Da den Tieren autologe Stammzellen appliziert wurden, ist eine immunbedingte Abwehrreaktion und damit im Zusammenhang stehende Ineffektivität der Zellen ausgeschlossen.

Die Applikation der mesenchymalen Stammzellen erfolgte mit dem zweiten Tag post operationem in der hoch inflammatorischen Phase der Knochenheilung. Während dieser Phase geben Entzündungszellen lysosomale Enzyme frei, welche Gewebetrümmer zersetzen (Remedios, 1999; Trostle et al., 1996). Es herrscht ein niedriger pH-Wert und ein geringer

Sauerstoffpartialdruck (Crues et al., 1975). Die Injektion der Stammzellen in dieses Milieu kann eventuell zu einer Schädigung der MSCs führen, die daraufhin nicht mehr in der Lage sind, die Knochenheilung zu unterstützen. Andererseits fördert die Inflammation die Migration spezifischer Zellen, die im Osteotomiegebiet mit residierenden Zellen interagieren. Als Folge werden Wachstumsfaktoren und lösliche Proteine freigesetzt und ein für die Stammzellen essentielles Milieu geschaffen (Cancedda et al., 2003). Dieses sensible Mikromilieu könnte durch die Injektion des Anzuchtmediums natürlich leicht gestört werden. Die Scherkräfte, die bei der Applikation der Stammzellen an der Kanülenspitze auftreten, könnten ebenfalls einen vitalitätshemmenden Einfluss auf die injizierten Zellen ausgeübt haben.

Mesenchymale Stammzellen können sich aufgrund ihrer Pluripotenz ebenso in Fibroblasten differenzieren (Remedios, 1999). Vielleicht treffen die applizierten Zellen hier auf Bedingungen, die sie zu einer fibroblastischen Differenzierungskaskade veranlassen.

Eine Schädigung der MSCs und

mögliche Beeinträchtigung des Hämatoms durch die Medium-Injektion könnte durch die Applikation der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt, eventuell erst nach Etablierung der atrophen Pseudarthrose, umgangen werden. Eine weitere Injektion würde die Heilung eventuell effektiver unterstützen.

5.2.3 Vergleich mit anderen Studien

Es existieren zwar Modelle, in der in ähnlicher Weise eine Heilungsstörung am Rattenfemur provoziert wurde, eine zellbasierende Therapie zur Induktion der Knochenheilung wurde an diesen Modellen bis heute nicht untersucht. Ein direkter Vergleich dieser mit anderen Studien ist demnach nicht möglich. Bisherige Studien unterscheiden sich von der vorgestellten Arbeit zum einen im Modelldesign, zum anderen in der gewählten Therapieform. Der Einfluss bestimmter Zellen oder Faktoren auf die gestörte Knochenheilung wurde meist an Defekten kritischer Größe unter Verwendung von Scaffolds untersucht.

Es kann, entsprechend der unten aufgeführten Studie von Makino und Mitarbeitern (2005) angenommen werden, dass trotz thermischer Deperiostierung das biologische Potential nicht völlig erloschen ist und durch entsprechende Interventionen die Heilung induziert werden kann. Das vorgestellte Modell eignet sich deshalb durchaus zur Erforschung therapeutischer Maßnahmen zur Behandlung von Heilungsstörungen, die der klinische Situation nachempfunden sind.

Trotz der Tatsache, dass im Knochenmark nur eine mesenchymale Stammzelle/100 000 kernhaltigen Zellen vorkommt (Bruder et al., 1997) konnten Connolly und Mitarbeiter (1989) durch die perkutane Injektion autologen Knochenmarks in den Bereich einer Heilungsstörung humaner Tibiae, die mit einem signifikanten Knochenverlust einhergingen, beeindruckende Resultate erzielen. Die durchschnittliche Zeit vom Auftreten der Fraktur bis zur Knochenmarksinjektion betrug in dieser klinischen Studie vier Monate. Bei keinem Patienten wurde die Fraktur zuvor osteogen stimuliert. Jedem Patienten wurde durchschnittlich 100-150 ml Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen und in der gleichen chirurgischen Sitzung mehrmals in 10-20 ml-Schritten in das Frakturareal injiziert. Neun der zehn Patienten zeigten im Injektionsbereich nach durchschnittlich vier Monaten röntgenologisch sichtbaren Kallus. Anders als in der hiesigen Studie erfolgte die Applikation in einen gut vaskularisierten Bereich. In dieser Studie war zum Zeitpunkt der Stammzellinjektion die Vaskularisierung der Osteotomiezone durch Deperiostierung und Knochenmarksentnahme extrem erniedrigt. Connolly gibt zwar an, dass Kallus gebildet wurde, ob eine Einigung der Fragmente stattfand, wird jedoch nicht berichtet. Auch erfolgte bei vier der zehn Patienten zur Reduktion der Fragmentinstabilität ein Verfahrenswechsel. Die Umstellung auf ein internes Fixationssystem könnte durch Erhöhung der Stabilität zu einem Fortschreiten der Heilung geführt haben, da bei diesen Patienten primär die verzögerte Heilung nicht auf eine reduzierte biologische Aktivität zurückzuführen war (Runkel et al., 2000). Die Applikation des eher zähen Knochenmarks bewirkt ein Verbleiben der Stammzellen am Ort der Injektion. Auch finden sich im Knochenmark neben den mesenchymalen Stammzellen Osteogenese-stimulierende Faktoren. In der klinischen Studie von Collony existierte keine Kontrollgruppe. Die Kallusbildung kann daher nicht eindeutig auf dem alleinigen Effekte der Knochenmarksinjektion zurückgeführt werden.

Kadiyala et. al. (1997b) konnten am Rattenfemur zeigen, dass syngene mesenchymale Stammzellen eine acht Millimeter lange Defektstrecke überbrücken. Die MSCs wurden dazu in einer Konzentration von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf einen Zylinder aus Hydroxyapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP) verbracht. Der Zylinder wurde anschließend in den diaphysären Defekt implantiert. Ebenfalls wurden zellfreie Zylinder in Defekte der Kontrollgruppen implantiert. Nach acht Wochen heilten die mit Zellen behandelten Defekte signifikant besser als diejenigen, in denen zellfreie Scaffolds implantiert wurden. In erstgenannten waren 40 % der Poren mit neu synthetisierten Knochen gefüllt, während nur 10 % der Poren der zellfreien Zylinder Knochen enthielten.

Bruder und Kollegen (1998a) zeigten in einem Defektmodell der athymischen Ratte, dass auch humane MSCs die Knochenheilung verbessern. Sie implantierten Scaffolds aus HA/TCP in einen acht Millimeter großen Defekt des Femurs, auf denen die humanen MSCs mit einer Dichte von ebenfalls $7,5 \times 10^6/\text{ml}$ gesät wurden. Radiologisch und histologisch konnte nach 12 Wochen, im Gegensatz zu Defekten, die mit zellfreien Konstrukten behandelt wurden, eine Einigung der Osteotomiefragmente erreicht werden.

Der erfolgreiche Einsatz mit autologen MSCs beladener Scaffolds ließ sich auch in Großtiermodellen bestätigen (Kon et al., 2000; Petite et al., 2000). Kon und Mitarbeiter (2000) schufen in einer Studie an der ovinen Tibia einen 35 mm großen Defekt und implantierten einen mit autologen MSCs beladenen HA/TAP-Zylinder in das Defektbett. Bei ihnen wiesen die zellbeladenen Konstrukte eine signifikant größere Knochenmenge verglichen mit zellfreien Konstrukten nach einer achtwöchigen Standzeit auf. Es findet sich noch eine Vielzahl vergleichbarer Studien, in denen sich die osteogenen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen beweisend darstellen lassen. Aus der Literatur ist bekannt, dass vor allem Tricalciumphosphat allein neben seinen osteokonduktiven auch durch seine osteoinduktiven Eigenschaften die Kallusbildung fördert (Kon et al., 2000). In der vorgestellten Studie wurden keine Trägermaterialien zur Bereitstellung der MSCs verwendet. Die Kortikalis wies im deperiostierten Bereich fast ausschließlich degenerierte Osteozyten resp. leere Osteozytenlakunen auf. Daher kann von einer avitalen kortikalen Strecke von ca. vier Millimetern ausgegangen werden, die es zu überbrücken galt. Die histologischen und histomorphometrischen Ergebnisse der Medium-Gruppe zeigen klar, dass ein Fortschreiten der Heilung ohne zusätzliche therapeutische Unterstützung nicht möglich ist. Die Ergebnisse der MSC-Gruppe verdeutlichen, dass sich das Injektionsmedium nicht als Trägermaterial zur Bereitstellung der MSCs im Reparaturgebiet eignete. Ein Scaffold würde als Leitschiene zum einen die avitale deperiostierte Strecke überbrücken, zum anderen den Zellen eine Nische bieten, an der sie haften bleiben und ein geeignetes Mikromilieu aufbauen könnten (Bianchi et al., 2001). Vorstellbar wäre eine Art resorbierbare Membran z. B. auf Basis von Kollagen oder Fibrin, auf der die Zellen gesät werden und welche um die deperiostierte Kortikalis gelegt werden könnte. Sie muss die Diffusion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren sowie das Einwachsen von Kapillaren erlauben. Das Implantieren der Membran müsste dann entweder während der Osteotomie oder in einer zweiten chirurgischen Sitzung erfolgen. Das Verfahren wäre dann aber nicht mehr als minimal invasiv zu bezeichnen.

Nach der Implantation der mit MSCs beladenen Scaffolds differenzieren sich die Stammzellen in knochenbildende Zellen. Durch die Zugabe von Dexamethason,

Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat in vitro differenzierten mesenchymale Stammzellen in osteogene Zellen (Jaiswal et al., 1997). Osteogen prädifferenzierte Zellen, die in ektooper Lage auf ein Scaffold aus HA/TAP implantiert wurden, führten im Vergleich zu undifferenzierten MSCs zu einer beschleunigten Knochenbildung (Okumura et al., 1997; Yoshikawa et al., 1996). Ebenfalls positive Ergebnisse konnten durch die lokale Injektion osteogen prädifferenzierter autologer Stammzellen in das Zentrum eines Distraktionskallus des Kaninchenunterkiefers erzielt werden (Shao et al., 2007). Durch die Zugabe in vitro osteogen stimulierender Substanzen zum Nährmedium könnte, in Anlehnung an die oben genannten Studien, eine Induktion der Knochenheilung in zukünftigen Modellen erzielt werden.

Bone Morphogenic Proteins (BMPs) übernehmen in der Knochenheilung eine wichtige Rolle. Sie fördern das Zellwachstum und in die Differenzierung von Osteoblasten (Reddi, 1992). Sie werden schon kurz nach dem Auftreten einer Fraktur im Frakturgebiet angetroffen (Bostrom et al., 1995). Heilungsstörungen können daher mit einer unzureichenden bzw. fehlenden BMP-Produktion assoziiert sein (Sakou, 1998). In einem atrophen Pseudarthrose-Modell der Ratte wurde der Einfluss von lokal applizierten humanen BMP-7 auf die Knochenheilung untersucht (Makino et al., 2005). Um eine atrophen Pseudarthrose zu schaffen, orientierte sich die Arbeitsgruppe um Makino am Modell von Kokubu. In deren Modell war das Heilungspotential ähnlich eingeschränkt wie das im vorgestellten Modell. Nach vier Wochen wiesen 63 % der Tiere, die eine lokale Applikation des rekombinanten BMP-7 erhielten, nach sechs Wochen alle Tiere eine knöcherne Überbrückung der Osteotomie auf. Die Kontrollgruppe zeigte auch nach acht Wochen keine Heilung. Anders als in der vorliegenden Arbeit applizierten Makino und Kollegen das BMP-7 in einem Kollagen-Puffer, dessen Viskosität ein Verteilen der BMPs in die umliegenden Weichteile verhindern sollte. Dem hier verwendeten Medium wurde keine die Viskosität steigernden Substanzen zugesetzt, so dass ein Verteilen der Zellen in die umliegenden Weichteile nicht ausgeschlossen werden kann. Da Makino und Mitarbeiter zur Stabilisierung der Osteotomie einen intramedullären Nagel verwendeten, wurde das BMP-7 intra operationem nicht in den Spalt, sondern um den Spalt appliziert. Im vorgestellten Modell erfolgte die Injektion der Stammzellen zwei Tage nach der Osteotomie möglichst in den Osteotomiespalt. Das dortige Milieu hemmte vielleicht die Zellen in ihrer weiteren Proliferation und für die Heilung notwendigen Differenzierung in osteogene Zellen.

Die Wirksamkeit der BMPs und von BMP-2-produzierenden MSCs wurde eindrucksvoll an einem critical size defect der Ratte bewiesen (Lieberman et al., 1999). Am Femur wurde dazu

einen acht Millimeter großen Defekt geschaffen. In jeder der Untersuchungsgruppen implantierten Lieberman und Kollegen 20 mg einer modifizierten demineralisierten Knochenmatrix, die nur noch geringe osteoinduktive Eigenschaften aufwies. Sie infizierten 5×10^6 autologe Ratten-MSCs mit einem BMP-2-produzierenden adenoviralen Vektor und implantierten diese in den Defekt. Diese Zellen können so über lange Zeit eine konstante Menge BMPs exprimieren. In einer weiteren Gruppe wurden die Defekte mit 20 µg rekombinanten humanen BMP-2 behandelt. Als Kontrollgruppen dienten Defekte, in denen 5×10^6 β -Galactosidase-produzierenden MSCs implantiert wurden, Defekte, die mit 5×10^6 uninfizierten autologen MSCs behandelt wurden sowie Defekte, in denen lediglich die demineralisierte Knochenmatrix implantiert wurde. Nach acht Wochen zeigten die mit den autologen MSCs behandelten Defekte, ebenso wie die anderen beiden Kontrollgruppen, radiologisch, histologisch und histomorphometrisch, analog der MSC-Gruppe der vorgestellten Arbeit, kein Anzeichen einer Heilung. Die mit BMP-2-produzierenden MSCs und mit rekombinanten BMP-2 behandelten Defekte überbrückten radiologisch und histologisch erfolgreich. Die Studie von Lieberman und Kollegen untermauert die Vermutung, dass native mesenchymalen Stammzellen ohne zusätzliche osteokonduktive und osteoinduktive Unterstützung nicht in der Lage sind, die Heilung einer Fraktur oder Osteotomie mit reduziertem biologischen Potential effektiv zu unterstützen.

5.2.4 Schlussfolgerung

Mesenchymalen Stammzellen kommen in Forschung und Klinik eine zunehmende Bedeutung zu. Das *in vitro* und *in vivo* osteogene Potential ist vielfach bewiesen worden. Es lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, dass undifferenzierte perkutan applizierte mesenchymale Stammzellen allein nicht in der Lage sind, kritisch ablaufende Knochenheilungen positiv zu beeinflussen. Die applizierten MSCs üben auf die Chondrogenese zwar einen Effekt aus, dieser ist aber hinsichtlich seiner Ausprägung klinisch irrelevant. Auf alle anderen untersuchten Parameter nehmen die Stammzellen keinen Einfluss. Um eine Heilung zu induzieren, müssen die mesenchymalen Stammzellen entweder auf ein osteokonduktiv wirksames Scaffold implantiert werden, osteogen prädifferentiert sein oder die Unterstützung osteoinduktiv wirkender Faktoren, wie z.B. Bone Morphogenic Proteins, erhalten. Auch sollte in zukünftigen Studien der Zeitpunkt der Stammzellapplikation überdacht werden. Die Applikation sollte möglichst nach der Entzündungsphase, vielleicht sogar nach Etablierung der atrophischen Pseudarthrose, erfolgen.

Aus der vorliegenden Arbeit wird die aus der Literatur bereits bekannte Bedeutung des Zusammenhangs Periost und Knochenheilung nochmals untermauert. Wird die Knochenhaut unfallkausal oder operationsbedingt zerstört, ist sie allein nicht in der Lage, zu regenerieren. Die Folge ist eine verzögerte oder ausbleibende Heilung (Stürmer, 1996). Die histologischen Bilder zeigen, dass sich die Faserschicht der Knochenhaut unabhängig vom Stratum cambium erneuern kann. Die vollständige Regeneration des Periosts scheint jedoch an die externe Kallusbildung gekoppelt zu sein. Eine Knochenheilung ohne Periost ist nicht möglich. Ist das Periost zerstört, kann ohne knöchernen Kallus keine periostale Rekonstruktion erfolgen. Beim Auftreten deperiostierter, insuffizient heilender Knochenfragmente muss die periostale Kallusbildung durch externe Maßnahmen unterstützt werden.